

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-070752

(43)Date of publication of application : 15.03.1994

(51)Int.Cl.

C12N 1/19
// C12P 21/02
(C12N 1/19
C12R 1:865)
(C12P 21/02
C12R 1:865)

(21)Application number : 04-187325

(22)Date of filing : 23.06.1992

(71)Applicant : ASAHI BREWERIES LTD

(72)Inventor : SHIMIZU JIRO
OKUMURA YASUSHI
OTANI TAKAYA

(54) HIGHLY GLUTATHIONE -CONTAINING YEAST AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the yeast massively producing and accumulating glutathione in its body by subjecting a glutathione production ability-increased yeast to a mutational treatment and subsequently aerobically culturing the produced azaserine-resistant strain, the glutathione production ability-increased yeast being produced by the introduction of a gene.

CONSTITUTION: A highly glutathione-producing yeast [preferably *Saccharomyces.cerevisiae* YHT178 strain (FERM P-13012)] produced by introducing a γ -glutamylcysteine-synthesizing enzyme gene into an yeast is first subjected to a mutational treatment, and the produced azaserine-resistant strain is aerobically cultured to provide the objective yeast producing glutathione in a remarkable amount in its body. When a yeast having a higher glutathione content is further desired, the azaserine-resistant strain is preferably subjected to a conjugation treatment or cell-fusion treatment. The objective yeast includes *Saccharomyces.cerevisiae* 62D strain (FERM P-13010) obtained from the YHT 178 strain.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 29.06.1993

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2034553

[Date of registration] 19.03.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-70752

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/19		7236-4B		
// C 1 2 P 21/02	G	8214-4B		
(C 1 2 N 1/19				
C 1 2 R 1:865)				
(C 1 2 P 21/02				

審査請求 有 請求項の数 4(全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-187325

(22)出願日 平成4年(1992)6月23日

(71)出願人 000000055

アサヒビール株式会社
東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72)発明者 清水 二郎

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ
ール株式会社応用技術研究所内

(72)発明者 奥村 康

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ
ール株式会社応用技術研究所内

(72)発明者 大谷 隆哉

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ
ール株式会社飲料食品研究所内

(74)代理人 弁理士 舟橋 榮子

(54)【発明の名称】 グルタチオン高含有酵母及びその製造法

(57)【要約】

【構成】 本発明は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素遺伝子を導入したグルタチオン高生産酵母に変異処理を行ってアザセリン耐性株を造成し、得られたアザセリン耐性株を好氣的培養することによって菌体内にグルタチオンを著量に生成することを特徴とするグルタチオン高含有酵母の製造法である。

【効果】 本発明によれば、従来の製法よりもグルタチオンの含有量の高い酵母をアミノ酸(L-システイン)を添加することなく取得することができ、また、変異処理によって得られたアザセリン耐性株を接合、さらには細胞融合処理することによって高度にグルタチオンを含有する酵母を取得できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ャーグルタミルシステイン合成酵素遺伝子を導入したグルタチオン高生産酵母に変異処理を行ってアザセリン耐性株を造成し、得られたアザセリン耐性株を好氣的培養することによって菌体内にグルタチオンを著量に生成することを特徴とするグルタチオン高含有酵母の製造法。

【請求項2】 遺伝子導入グルタチオン高生産酵母が、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) Y117株 (微工研条寄第13012号) であることを特徴とする請求項1に記載のグルタチオン高含有酵母の製造法。

【請求項3】 グルタチオン高含有酵母が、サッカロミセス・セレビジエ62D株 (微工研条寄第13010号) であることを特徴とする請求項1のグルタチオン高含有酵母の製造法。

【請求項4】 グルタチオン高含有酵母が、サッカロミセス・セレビジエ62D、62D株 (微工研条寄第13011号) であることを特徴とする請求項1のグルタチオン高含有酵母の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、グルタチオン高含有酵母、及びその製造法に関する。さらに詳しくは、遺伝子導入をしてグルタチオン生産能を増強した酵母に変異処理を行い、菌体内にグルタチオンを著量生成して蓄積させる酵母、及びその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 グルタチオンは、グルタミン酸、システイン及びグリシンから成るペプチドであり、肝疾患の治療薬、あるいは試薬として広く利用されている重要な化合物である。従来、グルタチオンは、有機合成法や酵母から抽出する方法によって製造されている。しかし、有機合成法は反応工程の長さや工程の複雑さの点で、また酵母からの抽出方法においては菌体から抽出されるグルタチオンの量に限界があるという点で問題があった。

【0003】 これらの欠点を解決すべく、これまで数々の改良がなされてきている。例えばグルタチオン生成に関係するアミノ酸を添加することによるグルタチオン製造法 (特公昭47-26314、特開昭53-94089、特公昭54-997、特開昭48-44487、特開昭51-36357) などがある。しかしながら、これらの方法はグルタチオンの生産量の点で満足のいくものではない。また、突然変異株取得によるグルタチオン製造法 (特公昭56-46826、特開昭48-61689、特公昭53-31956、特開昭61-209583) などがある。さらに、遺伝子操作を利用した微生物によるグルタチオン製造法 (特開昭58-20188、特開昭58-20196、特開昭61-52299、特開昭62-275685、特開昭64-51098) がある。

【0004】 これらは、グルタチオン合成能を向上させ

てはいるが、グルタチオン合成に必要でかつ律速となるL-システインの供給が十分に改良されておらず、グルタチオン高生産には同アミノ酸添加が必要と考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明では、酵母に変異処理を行いアザセリン耐性株を造成することによって、律速となるL-システインの菌体内合成系を強化し、従来の製法よりもグルタチオンの含有量の高い酵母をアミノ酸 (L-システイン) を添加することなく取得することを目的とする。

【0006】 また、変異処理によって得られたアザセリン耐性株を接合、さらには細胞融合処理することによって高度にグルタチオンを含有する酵母を取得することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明は、ヤ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子を導入したグルタチオン高生産酵母に、変異処理を行ってアザセリン耐性株を造成し、得られたアザセリン耐性株を好氣的培養することによって、好ましくは流加培養することによって、菌体内にグルタチオンを著量に生成することを特徴とするグルタチオン高含有酵母の製造法である。

【0008】 また、好ましくは、本発明はヤ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子を導入したグルタチオン高生産酵母に、変異処理を行ってアザセリン耐性株を造成し、得られたアザセリン耐性株の1倍体を他のグルタチオン高生産株の1倍体と接合して、多倍数体を造成し、得られた株を孢子形成させグルタチオン生産能及び成育能の優れた株をスクリーニングして、得られた株を好氣的培養することによって、好ましくは流加培養することによって、菌体内にグルタチオンを著量に生成することを特徴とするグルタチオン高含有酵母の製造法である。

【0009】 さらに好ましくは、本発明はヤ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子を導入したグルタチオン高生産酵母に、変異処理を行ってアザセリン耐性株を造成し、得られたアザセリン耐性株の1倍体を他のグルタチオン高生産株の1倍体と接合して多倍数体を造成し、得られた株を孢子形成させ、スクリーニングして得られたグルタチオン生産能及び成育能の優れた1倍体株の2株を細胞融合させて得られた株を好氣的培養することによって、好ましくは流加培養することによって、菌体内にグルタチオンを著量に生成することを特徴とするグルタチオン高含有酵母の製造法である。

【0010】 以下、本発明について詳細に説明する。本発明で用いる遺伝子導入グルタチオン高生産酵母は、大竹らが確立した手法 (1990年度日本農芸化学会大会要旨集、145頁、1990年) によって得られる酵母を用いることができる。すなわち、酵母由来のグルタチオン合成系酵素の一つであるヤ-グルタミルシステイン合成酵素

遺伝子をサッカロミセス・セレビジエの強発現プロモータ△P8に接続し、サッカロミセス・セレビジエの染色体 *trp1* 部位へ導入することによって遺伝子導入グルタチオン高生産酵母を造成することができる。

【0011】このような酵母としてはブタベスト条約に定める国際寄託当局に受託番号微生研条寄第13012号によって寄託されたものが好ましい。アザセリン耐性株を得るため変異源は、通常変異源として一般的に用いられる方法であればよく、紫外線、エチルメタンスルホン酸、ニトロソグアニジン、X線等を用いることができる。

【0012】本発明でいうアザセリン耐性株とは、システイン生合成に必要なセリン供給系が強化されることによりシステインの生合成が強化された変異株であり、本発明においては、YPD培地に対して25 μ g/ml濃度になるようにアザセリンを添加した培地で成育可能な株をいう。本発明で得られるアザセリン耐性株は、通常システインを培地に添加して培養した場合と同じようにグルタチオン生産量が増加する特徴を示した。

【0013】スクリーニングしたアザセリン耐性株の生育能をさらに改良するための方法としては、アザセリン耐性株との接合が可能な接合型の1倍体グルタチオン生産優良株を得て、その1倍体とアザセリン耐性株を接合して多倍数体を得ることができる。さらには、得られたアザセリン耐性株の多倍数体を孢子形成させ、グルタチオン生産優良株をスクリーニングすることが可能である。アザセリン耐性株との接合可能な1倍体優良株を得るには、1倍体の優良株2株を接合させ、多倍数体株を造成したのち孢子形成を行うという通常の方法をとることが出来る。

【0014】また、さらに、得られたアザセリン耐性株のグルタチオン生産性を高めるために多倍数体を造成することができる。多倍数体造成の手法としては、接合、あるいは細胞融合によって行うことができる。本発明の菌株の培養条件としては、一般に行われているように、培養温度20～34℃、培養pH4.5～6.5で好氣的に培養すれば特段の限定はされないが、特にグルタチオンの生産性を高めるには流加培養を行うのが望ましい。流加培養の条件は、ジャーファメンターを用い、グルコース、尿素、酵母抽出物および無機塩からなる培地に植菌し、通気量1vvm、温度30℃、DOレベルを最少1～5ppmとして、そこへグルコースと酵母抽出液の殺菌した混合液を0.05 l/hの速度で植菌後12時間流加する。流加時間は約12時間で初発液量の約1/40量を添加する。

【0015】

【発明の効果】本発明によれば、従来の製法よりもグルタチオンの含有量の高い酵母をアミノ酸(L-システイン)を添加することなく取得することができ、また、変異処理によって得られたアザセリン耐性株を接合、さらには細胞融合処理することによって高度にグルタチオン

を含有する酵母を取得できる。

【0016】

【実施例】以下、実施例をもって本発明を詳しく説明するが、これに限定されるものではない。

(1) 遺伝子導入グルタチン高生産酵母の造成

グルタチオン生合成系の遺伝子群を効率よく発現させるために、まず、酵母の染色体から強転写プロモーターのクローニングを行った。クローニングには、プロモーター検出ベクターpMC1585を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標に行った。その結果、活性の高いDNA断片としてP8プロモーター断片(約3.8kb)が得られた。このP8プロモーター断片から、機能領域のみの△P8(約0.4kb)を作成した。

【0017】次に、酵母の γ -グルタミルシステイン合成酵素遺伝子のクローニングを行った。すなわち、*S. cerevisiae* YNN27株(α *trp1* *ura3*)から、上記2種の酵素の欠損変異株を習得した。次に γ -グルタミルシステイン合成酵素欠損株(YH1)を用いて γ -グルタミルシステイン合成酵素遺伝子のクローニングを行った。YH1株をYE24をベクターとする遺伝子ライブラリーで形質転換し、ニトロプルシッドソーダを用いてスクリーニングを行ったところ、目的の遺伝子と思われる1種のプラスミド(pYOG1001)が得られた。更に得られた遺伝子のサブクローニングを行ったところ約4.4kbの断片上に目的の遺伝子(GSH1)が存在した。そこでこの遺伝子断片の全塩基配列を決定したところ、この断片は4,410塩基からなっていた。

【0018】このクローニングしたGSH1遺伝子の転写プロモーターを△P8と交換し、強発現化した△P8-GSH1断片をYNN27株の染色体上の*trp1*に挿入したYHT178株を作製した。YHT178株のGSH1活性とグルタチオン含量を測定したところ、GSH1活性は、0.29ユニットであり、グルタチオン含量は約1.5%であった。

【0019】(2) アザセリン耐性株の造成

YPD寒天培地(酵母エキス1%、ペプトン1%、グルコース2%、寒天1.5%)上で30℃、3日間培養したサッカロミセス・セレビジエYHT178株をYPD液体培地(YPD寒天培地から寒天を除いたもの)100mlの入った500ml容振盪フラスコに白金耳接種し、30℃、一晚振盪培養した。菌体を遠心分離(3000rpm、10分)で集め、50mlの蒸留水で洗浄した。続いて20mlの磷酸バッファー(pH7.5、0.1M)に懸濁し、エチルメタンスルホン酸600 μ lを添加した。30℃で1時間振盪した後、20mlの5%チオ硫酸ナトリウム溶液を加え5分間放置した。遠心分離で菌体を集め、20mlの蒸留水に再度懸濁した。この懸濁液をアザセリン25 μ g/mlを含むSD寒天培地(ディフコ社製イーストナイトロジェンベースW/Oアミノ酸0.67%、グルコース2%、ディフコ社製寒天1.5%)に接種し、30℃で3日間培養した。生育してきたコロニーを選択し、5mlのYPD培地の入った試験管に接

種し30℃、30時間振盪培養した。遠心分離で菌体を集め、蒸留水で洗浄後1mlの蒸留水に懸濁した。この懸濁液を100℃、5分間加熱した後、遠心分離にて上清を得た。上清中の抽出されたグルタチオンを比色定量に供した。

【0020】0.7mMのEDTAを含む0.36M、pH7の磷酸バッファー2.5mlに、ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)4mg/ml溶液100μl、NADPH 4mg/ml溶液50μl、グルタチオンリダクターゼ(オリエンタル酵母社製)0.5ユニットを加え、光路長1cmのガラス製キューベットへ入れ、25℃に加温した。そのキューベットへ適宜希釈しグルタチオンを測定レンジ濃度含むサンプルを10μl添加して反応を開始した。日立自記分光光度計320型を用いて412nmの吸光度を連続的に1分間記録した。同

様にして濃度既知のグルタチオン標準溶液をサンプルとして反応させ吸光度の増加を連続的に記録し、増加曲線の勾配を用いて検量線を作り、サンプルの勾配からサンプル中のグルタチオン含有を算出した。

【0021】約1000株のコロニーを処理しグルタチオン生産量が多かった60株を選択した。選択した株を100mlのYPD培地の入った500ml容振盪フラスコに接種し、30℃で3日間振盪培地した。培地終了後、試験管を用いて培養した場合と全く同様にして、各菌株のグルタチオン生産量を比較した。その結果、菌体あたりのグルタチオン含量が最も高いASR6-32株を選択した。表1にYHT178とASR6-32の比較を示す。

【0022】

【表1】

菌株名	グルタチオン含有率(%)	菌体量(mg/ml)
YHT178	2.25	2.88
ASR6-32	3.39	1.29

数値は、100ml YPD培地を含む500ml容坂口フラスコで30℃、3日間培養した時の値である。

【0023】(3) アザセリン耐性株ASR6-32の改良1倍体株の造成

次に、この変異株の生育能を改善するために接合によって多倍体株とすることを試みた。まず、YHT178株とサッカロミセス・セレピジェの実験室株AH22株(ATCC 38626)を接合させた。前者はトリプトファン、ウラシル要求性であり、後者はヒスチジン、ロイシン要求性を有しているため、両者が接合した株は最少培地(SD培地)で生育できるが、接合していない株は生育できないことを利用して接合株を選択した。得られた株を孢子形成培地(酵母エキス0.1%、グルコース0.05%、酢酸カリウム1.0%、寒天2.0%)に接種し、30℃で約10日間培養した。孢子を形成している接合株を白金耳取り、0.1mg/mlのザイモリエース(生化学工業、10万ユニット/g)水溶液1mlに懸濁し、30℃で15分間静置した。この

懸濁液をナリング株式会社製マイクロマニピレータ、MN-188/MD-188型を用いて形成している孢子を分離した。分離した孢子の中から接合型がaでありかつグルコース生産性がYHT178同程度の株YHT182を選択した。YHT182とASR6-32を同様にして接合、孢子形成、孢子分離を行い、得られた株約100株をYPD培地で培養して、グルタチオン生産能及び生育を比較した。しかして、生育とグルタチオン生産能の両方を満足する株62D株を習得した。両株を100mlのYPD培地の入った500ml容フラスコに接種し、30℃で3日間振盪培養し、実施例1に示した方法と全く同様にしてグルタチオン含量、菌体量等を比較した。結果を表2に示した。表2は、YHT178株と62D株の比較を示す。62D株は微生研条寄第13010号によって寄託された。

【0024】

【表2】

菌株名	グルタチオン含有率(%)	菌体量(mg/ml)	グルタチオン生産量(mg/L)
YHT178	2.00	3.69	73.8
62D	4.17	4.20	175.0

【0025】(4) アザセリン耐性株62D株の多倍体株の造成

得られたグルタチオン高生産酵母62D株(ura3⁻, his3⁻)をさらに改変した。まず、プラスミドYEp24を制限酵素HindIIIで、またプラスミドY101を制限酵素BamHIで各々完全消化した。アガロースゲル電気泳動に供し

URA3遺伝子断片を含むDNA断片及びHIS3遺伝子を除去した残りのY101プラスミド断片を分離した。マニアチス(Maniatis, T.)ら、【モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、1982年】の方法に準拠してURA3遺伝子をHIS3遺

伝子を除去した Ylpベクターへ連結してプラスミド pYI-U3 を作製した。

【0026】62D株をYPD培地に接種し、30℃、16時間振盪培養し、遠心分離にて菌体を集めた。洗浄後、菌濃度約 1×10^{10} cells/ml になるように氷冷した 1 M ソルビトールに懸濁した。この懸濁液 40 μ l に先に調製したプラスミド pYI-U3 を約 20 μ l/ml 濃度含む溶液 5 μ l を加え、氷冷した。氷冷しておいたエレクトロポレーション用キュベット（バイオラッド社製 165-2086）へ菌及びプラスミドが混合している懸濁液を入れた。このキュベットをジーンパルサー（バイオラッド社製）へセットした。装置を 1 kV、25 μ F に設定し、パルスコントローラーを 200 Ω とした。タイムコンスタントを 4 msec とし、エレクトロポレーションを行った。氷冷しておいた 1 M ソルビトール溶液 1 ml をキュベットへ添加し、良く攪拌した。その後、ヒスチジンを 20 μ g/ml 含む SD 寒天培地に接種し、30℃で約 3 日間培養した。生育してきたコロニーを YPD 寒天培地へ移植した。同様にして、62D 株に Ylp1 を導入し、形質転換を行った。しかして、62D (his3) 及び 62D (ura3) を得た。

【0027】3 台の 5 L ジャーファメンター（丸菱バイオエンジニア MDL500 型）に、グルコース 2%、尿素 0.6%、酵母抽出物（ミースト、アサヒビール社製）0.4%、 KH_2PO_4 0.15%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 Na_2SO_4 0.2%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.32ppm、Fe

$\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.45ppm、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2ppm からなる培地 2400ml を入れ、120℃、15 分間殺菌した。上記種菌液 1750ml を 3000rpm、5 分間遠心分離後、上清を捨て、殺菌水 500ml で洗浄し、再度同条件で遠心分離した。得られた沈殿物に殺菌水を加え 875ml とし、この 2 倍濃縮種菌液を 3 台のジャーファメンターに各々 125 ml、250 ml、500 ml、接種した。接種時の生菌数は各々 2.75×10^7 cells/ml、 6.25×10^7 cells/ml、 9.00×10^7 cells/ml であった。通気量 1.0vvm、攪拌数 600rpm、30℃、2% アンモニア水により pH 5.0 に制御し、1% のシリコーン消泡剤（東芝シリコーン社 TSA737F）を使用し、48 時間培養した。培養中、グルコース 15%、ミースト 3% からなる培地 600ml を接種後 12 時間より 0.05 l/h の速度で 12 時間流加した。

【0028】酵母菌体を含む培養液 1ml を熱水抽出処理し、遠心分離後得られた菌体抽出液のグルタチオン生産量は、Titze 法 (Anal. Biochem., 27, 502 (1969)) に従い 412nm の吸収増加で測定した。凍結乾燥により乾燥菌体重量を測定し、グルタチオン生産量からグルタチオン含有率を算出した。培養 48 時間のグルタチオン生産量、グルタチオン含有率、乾燥菌体重量は、表 3 に示す。表 3 は 62D/62D 株のグルタチオン生産量を示す。

【0029】

【表 3】

接種菌数 (cells/ml)	グルタチオン含有率 (%)	菌体重 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (mg/L)
2.75×10^7	3.68	20.10	739.7
6.25×10^7	3.80	20.71	786.8
9.00×10^7	3.65	23.73	866.1

次に作成した上記 2 株の細胞融合を行った。YPD 培地 100ml を含む 500ml 容振盪フラスコに上記の菌株を接種し、30℃で約 16 時間培養した。菌を遠心分離で集め無菌水で洗浄後、STE バッファー（1 M ソルビトール、20 mM EDTA、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.4)）100ml に懸濁した。そこへ β -メルカプトエタノール 39 μ l を加え 30℃で 10 分間処理した。遠心分離で集菌し、0.1mg/ml 濃度のザイモリエース（生化学工業製、10 万ユニット/g）を含む ST バッファー（1 M ソルビトール、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.4)）10ml に懸濁し 30℃で 20 分間反応させてプロトプラストとした。遠心分離で集菌し、ST バッファーで 1 回洗浄した。その後、10 mM の CaCl_2 を含む ST バッファー（STC バッファー）10ml に懸濁した。各々の懸濁液中の細胞数を血球計算盤で数え、 1×10^7 個を混合した。遠心分離で集菌した後、10 mM CaCl_2 を含む ST バッファー 1ml に懸濁し、30℃で 15 分間加温した。再

び、遠心分離で集菌し、1ml の PCT バッファー（35% PEG 4000、10 mM トリスー塩酸 (pH 7.4)、10 mM CaCl_2 ）に懸濁し 30℃、10 分間融合を行わせた。集菌し、STC バッファーで洗浄し、1ml の STC バッファーに懸濁した。1 M ソルビトールを含む SD 寒天培地へ、この懸濁液 100 μ l を接種、30℃で約 5 日間培養した。生育してきたコロニーを約 100 株、YPD 培地へ移し、さらに 7 日間 30℃で培養した。

【0030】上記の約 100 株を 5ml の YPD 培地を含む試験管で 30℃、3 日間振盪培養し、グルタチオン含量及び生育を選択指標として優良株を選択した。しかして、62D/62D 株を選んだ。62D/62D 株は微工研条寄第 13011 号で寄託された。表 4 に各菌株を YPD 培地を用い 30℃、3 日間振盪培養した時の結果を示す。

【0031】

【表 4】

菌株名	グルタチオン含有率 (%)	菌体量 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (ml/L)
YHT178	2.00	3.69	73.8
62D	4.17	4.20	175.0
62D/62D	4.53	5.10	231.0

【0032】(5) グルタチオン高含有酵母の培養、その1

グルコース2%、イーストエキストラクト（ディフコ社製）1%、バクトペプトン（ディフコ社製）1%よりなる培地を調製し、500 ml振盪フラスコに100mlにて24時間振盪培養し、種菌液とした。5 Lジャーファメンター（丸菱バイオエンジニア MDL500 型）に、グルコース2%、尿素0.6%、酵母抽出物（ミースト、アサヒビール社製）0.4%、 KH_2PO_4 0.15%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 Na_2SO_4 0.2%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.32ppm、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.45ppm、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2ppmからなる培地2400mlを入れ、120℃、15分間殺菌後、上記種菌液100mlを接種し、通気量1.0vvm、攪拌数400rpm、30℃、2%アンモニア水によりpH5.0に制御し、1%のシリコーン消泡剤（東芝シリコーン社、TSA7

37F）を使用し、48時間培養した。培養中、グルコース15%、ミースト3%からなる培地600mlを接種後8時間より0.051/hの速度で12時間流加した。

【0033】酵母菌体を含む培養液1mlを熱水抽出処理し、遠心分離後、得られた菌体抽出液のグルタチオン生産量は、Titze 法（Anal. Biochem., 27, 502 (1969)）に従い412nmの吸収増加で測定した。凍結乾燥により乾燥菌体重量を測定し、グルタチオン生産量からグルタチオン含有率を算出した。培養35時間のグルタチオン生産量は、700mg/L、グルタチオン含有率は、4.22%、乾燥菌体重量16.6mg/mlであった。同様な条件によるYHT178株との比較は表5に示す。表5は62D/62D株とYHT178株の比較を示す。

【0034】

【表5】

	グルタチオン含有率 (%)	菌体重 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (mg/L)
62D/62D	4.22	16.60	700.5
YHT178	1.47	8.70	127.9

(6) グルタチオン高含有酵母の培養、その2
グルコース2%、イーストエキストラクト（ディフコ社製）1%、バクトペプトン（ディフコ社製）1%よりな

る培地を調製し、2000ml振盪フラスコに500ml注入した。120℃、15分間殺菌後、62D/62D株を接種し、30℃にて24時間振盪培養し、種菌液とした。

【手続補正書】

【提出日】平成4年7月9日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】次に、酵母のγ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子のクローニングを行った。すなわち、*S. cerevisiae* YXX27株（ α urp1 ura3）から、上記2種の酵素の欠損変異株を取得した。次にγ-グルタミルシステイン合成酵素欠損株（YH1）を用いてγ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子のクローニングを行った。YH1株をYEp24をベクターとする遺伝子ライブラリーで形質転換し、ニトロフルシッドソーダを用いてスクリーニ

ングを行ったところ、目的の遺伝子と思われる1種のプラスミド（pYOG1001）が得られた。更に得られた遺伝子のサブクローニングを行ったところ約4.4kbの断片上に目的の遺伝子（GSH1）が存在した。そこでこの遺伝子断片の全塩基配列を決定したところ、この断片は4,410塩基からなっていた。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】

【表2】

菌株名	グルタチオン含有率 (%)	菌体量 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (mg/L)
YHT178	2.00	3.69	73.8
62D	4.17	4.20	175.0

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】次に作成した上記2株の細胞融合を行った。YPD培地 100mlを含む 500ml容振盪フラスコに上記の菌株を接種し、30℃で約16時間培養した。菌を遠心分離で集め無菌水で洗浄後、STEバッファー（1Mソルビトール、20mMEDTA、10mMトリス塩酸（pH7.4））100mlに懸濁した。そこへβ-メルカプトエタノール39μlを加え30℃で10分間処理した。遠心分離で集菌し、0.1mg/ml濃度のザイモリース（生化学工業製、10万ユニット/g）を含むSTバッファー（1Mソルビトール、10mMトリス塩酸（pH7.4））10mlに懸濁し30℃で20分間反応させてプロトプラストとした。遠心分離で集菌し、STバッファーで1回洗浄した。その後、10mMのCaCl₂を含むSTバッファー（STCバッファー）10mlに懸濁した。各々の懸濁液中の細胞数を血球計算盤で数え、 1×10^7 個を混合した。遠心分離で集菌した後、10mM CaCl₂を含むSTバッファー1mlに懸濁し、30℃で15分間加温した。再び、遠心分離で集菌し、1mlのPCTバッファー（35%PEG4000、10mMトリス塩酸（pH7.4）、10mM CaCl₂）に懸濁し30℃、10分間融合を行わせ

た。集菌し、STバッファーで洗浄し、1mlのSTCバッファーに懸濁した。1Mソルビトールを含むSD寒天培地へ、この懸濁液 100μlを接種、30℃で約5日間培養した。生育してきたコロニーを約100株、YPD培地へ移し、さらに7日間30℃で培養した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】上記の約100株を5mlのYPD培地を含む試験管で30℃、3日間振盪培養し、グルタチオン含量及び生育を選択指標として優良株を選択した。しかし、62D/62D株を選んだ。62D/62D株は微工研条寄第13011号で寄託された。表3に各菌株をYPD培地を用い30℃、3日間振盪培養した時の結果を示す。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】

【表3】

菌株名	グルタチオン含有率 (%)	菌体量 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (mg/L)
YHT178	2.00	3.69	73.8
62D	4.17	4.20	175.0
62D/62D	4.53	5.10	231.0

(5) グルタチオン高含有酵母の培養、その1
グルコース2%、イーストエキストラクト（ディフコ社製）1%、バクトペプトン（ディフコ社製）1%よりなる培地を調製し、500ml振盪フラスコに100mlにて24時間振盪培養し、種菌液とした。5Lジャーフェメンター（丸菱バイオエンジニアリング社製）に、グルコース2%、尿素0.6%、酵母抽出物（ミースト、アサヒビール社製）0.4%、KH₂PO₄ 0.15%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、Na₂SO₄ 0.2%、CaCl₂・2H₂O 0.03%、ZnSO₄・7H₂O 1.32ppm、FeCl₃・6H₂O 1.45ppm、CuSO₄・5H₂O

0.2ppmからなる培地2400mlを入れ、120℃、15分間殺菌後、上記種菌液100mlを接種し、通気量1.0vvm、攪拌数400rpm、30℃、2%アンモニア水によりpH5.0に制御し、1%のシリコーン消泡剤（東芝シリコーン社、TSA737F）を使用し、48時間培養した。培養中、グルコース15%、ミースト3%からなる培地600mlを接種後8時間より0.05l/hの速度で12時間流加した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】酵母菌体を含む培養液1mlを熱水抽出処理し、遠心分離後、得られた菌体抽出液のグルタチオン生産量は、Titze法(Anal. Biochem., 27, 502 (1969))に従い412nmの吸収増加で測定した。凍結乾燥により乾燥菌体重量を測定し、グルタチオン生産量からグルタチオン含有率を算出した。培養35時間のグルタチオン生産量は、700mg/L、グルタチオン含有率は、4.22%、乾燥菌体重量16.6mg/mlであった。同様な条件によるYHT

178株との比較は表4に示す。表4は62D/62D株とYHT178株の比較を示す。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】

【表4】

	グルタチオン含有率 (%)	菌体重 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (mg/L)
62D/62D	4.22	16.60	700.5
YHT178	1.47	8.70	127.9

(6) グルタチオン高含有酵母の培養、その2
グルコース2%、イーストエクストラクト(ディフコ社製)1%、バクトペプトン(ディフコ社製)1%よりなる培地を調製し、2000ml振盪フラスコに500ml注入した。120℃、15分間殺菌後、62D/62D株を接種し、30℃にて24時間振盪培養し、種菌液とした。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】3台の5Lジャーファメンター(丸菱バイオエンジニア MDL500型)に、グルコース2%、尿素0.6%、酵母抽出物(ミースト、アサヒビール社製)0.4%、 KH_2PO_4 0.15%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%、 Na_2SO_4 0.2%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.32ppm、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.45ppm、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2ppmからなる培地2400mlを入れ、120℃、15分間殺菌した。上記種菌液1750mlを3000rpm、5分間遠心分離後、上清を捨て、殺菌水500mlで洗浄し、再度同条件で遠心分離した。得られた沈殿物に殺菌水を加え875mlとし、この2倍濃縮種菌液を3台のジャーファメンターに各々125ml、250ml、500ml、接種した。接種時の生菌数は各々 2.75×10^4 cells/ml、 6.25×10^4 cells/ml、 9.00×10^4 cells/mlであった。通気量1.0vvm、攪拌数600rpm、30℃、2%ア

ンモニア水によりpH5.0に制御し、1%のシリコーン消泡剤(東芝シリコーン社 TSA737F)を使用し、48時間培養した。培養中、グルコース15%、ミースト3%からなる培地600mlを接種後12時間より0.05 l/hの速度で12時間流加した。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正内容】

【0033】酵母菌体を含む培養液1mlを熱水抽出処理し、遠心分離後得られた菌体抽出液のグルタチオン生産量は、Titze法(Anal. Biochem., 27, 502 (1969))に従い412nmの吸収増加で測定した。凍結乾燥により乾燥菌体重量を測定し、グルタチオン生産量からグルタチオン含有率を算出した。培養48時間のグルタチオン生産量、グルタチオン含有率、乾燥菌体重量は、表5に示す。表5は62D/62D株のグルタチオン生産量を示す。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正内容】

【0034】

【表5】

接種菌数 (cells/ml)	グルタチオン含有率 (%)	菌体重 (mg/ml)	グルタチオン生産量 (mg/L)
2.75×10^7	3.68	20.10	739.7
6.25×10^7	3.80	20.71	786.8
9.00×10^7	3.65	23.73	866.1

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵
C 1 2 R 1:865)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所